ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINASE-INHIBITOREN AUS DER GLANDULA SUBMANDIBULARIS VON HUNDEN

1972

Eugen Jaumann

aus

Ingolstadt / Donau

aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Eugen Werle

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINASE-INHIBITOREN AUS DER GLANDULA SUBMANDIBULARIS VON HUNDEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eugen Jaumann
aus
Ingolstadt/Donau

München 1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

UNIV. LEIDEN BIBL.

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Hans Fritz

Prof. Dr. Dr. Eugen Werle

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.2.1972

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle danke ich für die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. H. Fritz für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen.

Herrn Dipl. Chem. Dr. E. Fink danke ich für viele Ratschläge bei der technischen Durchführung der Arbeit.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen	
1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2	Einführende Übersicht	2
2.1	Vorkommen	2
2.2	Aufgabe und Wirkungsweise	3
2.3	Isolierungsmethoden	6
2.4	Physiologische Bedeutung	7
2.5	Der Proteinase-Inhibitor aus der Glandula submandibularis vom Hund	7
3	Isolierung	10
3.1	Gewinnung des Rohextraktes	10
3.1.1	Adsorption der wäßrigen Extrakte an CM-Cellulose	10
3.1.2	Entsalzung	11
3.2	Chromatographische Trennmethoden	12
3.3	Bestimmung der Enzymaktivität und der Enzymhemmung	14
3.3.1	Trypsin	14
3.3.2	Chymotrypsin	15

3.3.3	Plasmin	16
3.3.4	Subtilisin, Aspergillus O yzae Protease, Pronase	16
3.3.5	Elastase	17
4	Ergebnisse und Diskussion	18
4.1	Isolierung	18
4.2	Aminosäurezusammensetzung	28
4.3	Molekulargewicht	32
4.4	Hemmspektrum	33
4.5	Reaktive Zentren	44
4.6	Physiologische Funktion	46
5	Zusammenfassung	47
	Literaturverzeichnis	50
	Lebenslauf	

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

BAPNA	Nα-Benzoyl-DL-Arginin-p-nitroanilid
CM	Carboxymethyl
CPAPNA	N-3-(Carboxypropionyl)-L-Phenylalanin-p-nitroanilid
GSMI	Inhibitor aus der Glandula submandibularis des Hundes
I.U.	Inhibitor-Units
mI.U.	Milli-Inhibitor-Units
MG	Molekulargewicht
PKI	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen
TEA	Triäthanolamin-hydrochlorid
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Proteinasen-Inhibitoren gewinnen seit ihrer Entdeckung vor mehr als drei Jahrzehnten immer mehr an theoretischer und praktischer Bedeutung.
Sie besitzen durchwegs Proteincharakter (Proteine, Polypeptide, Glykoproteide). Gefunden wurden sie in großer Vielfalt in pflanzlichen und tierischen Geweben. Die physiologische Funktion dieser speziellen Eiweißstoffe ist allerdings noch weitgehend ungeklärt. Ihr Vorhandensein in der Vielzahl der bis jetzt untersuchten Organismen weist jedoch schon auf ihre Bedeutung hin.

Sehr viele Arbeitsgruppen mit den verschiedensten Zielsetzungen befassen sich mit der Erforschung der Proteinasen-Inhibitoren und ihren möglichen Anwendungsgebieten. Die Gründe für dieses große Interesse dürften darin liegen, daß die Reindarstellung von Inhibitoren mit relativ einfachen Methoden zu bewerkstelligen ist und daß mit Hilfe der Inhibitoren weitere Erkenntnisse über den Bau und die katalytische Funktion der Enzyme gewonnen werden können. In der Klinik finden sie als diagnostisches Hilfs-

mittel Verwendung und in der Therapie werden sie angewandt bei der unphysiologischen Freisetzung von Enzymen.

Meine Aufgabe war es, den Proteinasen-Innibitor aus der Glandula submandibularis vom Hund rein darzustellen und eingehend zu charakterisieren.

2 EINFÜHRENDE ÜBERSICHT

2.1 Vorkommen

1929 fanden Frey, Kraut und Werle (5) in Rinderorganen einen Kallikreinhemmstoff, der sich dann später als identisch mit dem 1936 von Kunitz und Northrop im Rinderpankreas gefundenen Trypsininhibitor erwies (6).
Seit dieser wegweisenden Entdeckung wurden immer menr Inhibitoren in tierischen und menschlichen Geweben und Sekreten entdeckt.
Der am längsten bekannte und eingehend von Kunitz (1-3) untersucht pflanzliche Inhibitor ist der Trypsininnibitor aus Soja-

bohnen (4). Auch andere untersuchte Leguminosen enthalten grössere Mengen an Inhibitor.
Ausführliche Untersuchungen wurden auch an Inhibitoren aus verschiedenen Getreidearten durchgeführt, ebenso an Inhibitoren aus Kartoffeln und Erdnüssen.
Eine ausführliche Zusammenstellung der bis jetzt entdeckten und untersuchten Inhibitoren ist zu finden in der Monographie von Vogel, Trautschold und Werle (7).

2.2 Aufgabe und Wirkungsweise

Proteinasen-Inhibitoren beeinflussen die katalytischen Aktivitäten von Enzymen; sie sind wichtig für die Kontrolle der Aktivität proteolytischer Enzyme.
Es gibt Proteinasen-Inhibitoren, die spezifisch nur gegen ein einziges Enzym wirksam sind. Polyvalente Proteinasen-Inhibitoren dagegen können verschiedene Enzyme hemmen; diese Inhibitoren können auch zwei oder mehrere reaktive Zentren aufweisen.
Trypsin-Inhibitoren können, entsprechend den Spezifitätserfordernissen des Trypsins, einen Lysin- oder Argininrest im reaktiven Zentrum besitzen. Ein spezieller Lysin- bzw. Argininrest des Inhibitormoleküls ist also unmittelbar verantwortlich für die Bindung an das Trypsinmolekül. Werden die ε-Aminogruppen der Lysinreste eines Inhibitormoleküls acyliert und verschwindet an-

schließend seine Hemmwirkung, so handelte es sich um einen Lysin-Inhibitor. Die Hemmaktivität von Arginin-Innibitoren bleibt bei dieser Reaktion erhalten. Ihre Hemmwirkung wird durch Modifizierung der Guanidino-Gruppen der Argininreste irreversibel blockiert.

Besitzt ein Inhibitor mehr als e i n reaktives Zentrum, so kann er unter Komplexbildung zwei Enzyme g l e i c h z e i t i g hemmen, wie es z. B. beim Inhibitor aus der Glandula submandibularis des Hundes der Fall ist.
Liegen jedoch die beiden reaktiven Zentren eines Inhibitormoleküls so dicht nebeneinander, daß bei der Besetzung durch ein Enzym das andere reaktive Zentrum überdeckt wird, so spricht man von sich überlappenden reaktiven Zentren. Diese Inhibitoren können, obwohl sie zwei reaktive Zentren besitzen, jeweils nur ein einziges Enzym hemmen.
Bei der Bindung des Inhibitors an das Enzymmolekül lagert sich dessen reaktives Zentrum an das aktive Zentrum des Enzyms an. Diese Art der Hemmung wird als kompetitiv bezeichnet. Der Inhibitor konkurriert mit dem Substrat um die Besetzung des aktiven Zentrums im Enzymmolekül. Der Grad der Hemmung ist in diesem Fall abhängig von der Konzentration an Inhibitor und Enzym einerseits und andererseits von der relativen Affinität des Inhibitors zum Enzym. Bei einer nicht kompetitiven Hemmung wirkt der Inhibitor durch direkte Beeinflussung des Enzymmoleküls. Der Angriffspunkt liegt nicht am aktiven Zentrum des Enzyms; der In-

hibitor greift an einer anderen Stelle in die Struktur des Moleküls ein. Der Hemmgrad ist dabei nur abhängig von der Inhibitorkonzentration und von der Affinität des Inhibitors zum Enzym.

Der Reaktionsmechanismus bei den natürlichen Proteinasen-Inhibitoren wird von Laskowski (8-10) in folgender Weise dargestellt:

$$T + I \rightleftharpoons L \rightleftharpoons C \rightleftharpoons L' \rightleftharpoons T + I'$$

T Trypsin
I nicht modifizierter Innibitor
L lockerer Komplex von Trypsin mit nicht modifiziertem Inhibitor

C stabiler Komplex
L' lockerer Komplex mit modifiziertem Innibitor (Michaelis-Menten-Komplex)

I' modifizierter Inhibitor

Bei vielen Innibitoren konnte man nach längerer Inkubation eine kontinuierliche Abnahme des Hemmvermögens beobachten. Dieses Phänomen der sogenannten "temporären Hemmung" beruht auf der tryptischen Spaltung des im Trypsin-Innibitor-Komplex gebundenen Hemmstoffs. Von den Innibitoren aus tierischen Organen mit einem MG unter 12 000 sind alle außer dem polyvalenten Kunitz-Inhibitor aus Rinderorganen temporär (13-17). Der Abbau des Inhibitors könnte entweder durch im Überschuß vorhandenes freies Trypsin (11) oder durch das im Komplex gebundene Trypsinmolekül erfolgen; für letztere Möglichkeit wurde der Nachweis von Tschesche und Mitarb. geführt (12). Wahrscheinlich sind beide Reakti-

onsarten möglich.

2.3 Isolierungsmethoden

Die charakteristische Eigenschaft der Inhibitoren, mit Proteasen Komplexe zu bilden, trug sehr zur Vereinfachung der Isolierungsmethoden bei.
Diese Eigenschaft machten sich Kunitz und Northrop (6) zunutze. Sie versetzten inhibitorhaltige Fraktionen mit Trypsin, reinigten den gebildeten Trypsin-Inhibitor-Komplex durch wiederholtes Aussalzen und fällten das Trypsin mit Trichloressigsäure aus.

Kassell u. Mitarb. (19,20) entwickelten diese Methode noch weiter. Sie reinigten den nach der Kunitz'schen Methode gewonnenen Komplex an Dowex 1-X2 und trennten die durch Dialyse gegen verdünnte Salzsäure freigesetzten Komponenten durch Fraktionierung über Sephadex G-50.
Eine weitere Vereinfachung brachte das von Fritz u. Mitarb. angewandte Isolierungsverfahren mittels wasserunlöslicher Trypsinharze (21-24). Diese einfache, spezifische Methode, mit der hohe Ausbeuten erzielt werden konnten, brachte zu den bisher üblichen Isolierungsmethoden der Proteinchemie wie Fällung, Extraktion durch Lösungsmittel, Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und Elektrophorese eine wirkungsvolle Ergänzung.

2.4 Physiologische Bedeutung

Die Kenntnisse über die Physiologie der Innibitoren sind vergleichsweise gering und Diskussionen darüber weitgehend auf Mutmaßungen angewiesen. Im allgemeinen sind die Inhibitoren als ein Kontrollsystem anzusehen, das bei proteolytischen Prozessen im lebenden Organismus als Gegenspieler der Enzyme wirksam werden soll. Beide Systeme sollten dabei am Ort ihrer Entstehung und Wirkung sich gegenseitig kontrollieren und ergänzen.

2.5 Der Proteinasen-Inhibitor aus der Glandula submandibularis vom Hund

Im Gewebe der Glandula submandibularis des Hundes wurde die bisher höchste Konzentration eines Proteinasen-Inhibitors in einem tierischen Gewebe gefunden. 1 g frisches Submandibularisgewebe enthält je nach Funktionszustand der Drüse bis zu 5 mg Innibitor. Auch im Speichel des Hundes wurde der Inhibitor in wechselnden Konzentrationen (in Abhängigkeit vom Funktionszustand der Drüse) gefunden. Es handelt sich also wie beim Innibitor aus der Bauchspeicheldrüse um ein Sekretprotein, das aber nur exkretorisch abgesondert wird (26).

Entdeckt wurde der Inhibitor 1963 von Trautschold, Werle, Haendle und Sebening (25); weiterführende Untersuchungen über diesen In-

hibitor sind in der Habilitationsschrift von Trautschold (26) und der Dissertationsarbeit von Haendle (27) niedergelegt.

Außer bei den Caniden und Feliden wurde noch bei einigen anderen Tiergruppen, ausschließlich Carnivoren, Inhibitoraktivität in der Glandula submandibularis gefunden. Beim Menschen zeigte sich in dieser Drüse keine Inhibitoraktivität gegenüber Trypsin (28).

Nach den bisherigen Ergebnissen, die überwiegend von Trautschold u. Mitarb. (26) stammen, stellt sich der Inhibitor aus der Glandula submandibularis des Hundes als ein basisches Polypeptid mit einem MG von 6 500 und einem isoelektrischen Punkt von 12,0 und 12,5 dar, je nach Fraktion. Er ist weitgehend säure- und hitzestabil.

Die Untersuchung des Hemmspektrums ergab, daß HSMI als polyvalenter Trypsininhibitor neben Trypsin und Chymotrypsin auch Papain hemmt.

Trautschold verwandte zur präparativen Auftrennung von HSMI die Elektrophorese mit Cellulose-Acetatfolien als Trägermaterial. Diese doch ziemlich aufwendige Methode erlaubte nur die Aufarbeitung von geringen Mengen Drüsenmaterial und erbrachte auch nur entsprechend geringe Ausbeuten.

Für die geplante Sequenzierung und Untersuchung der reaktiven Zentren von HSMI mußte ein leistungsfähiges Verfahren gefunden werden, das hohe Ausbeuten liefern konnte. Dies gelang uns im

Verlauf unserer Untersuchungen über HSMI, sodaß wir in der Lage waren, die bisherigen Angaben, insbesondere das Molekulargewicht, die Aminosäurezusammensetzung und das Hemmspektrum von HSMI zu ergänzen und zu verbessern. Trautschold hatte noch auf Grund seiner Aminosäureanalysen ein Molekulargewicht von etwa 6 500 für beide Fraktionen errechnet. Das mit Hilfe der Gelfiltration ermittelte Molekulargewicht lag jedoch zwischen 13 000 - 14 000. Eine eventuelle Assoziation zweier Moleküle wurde damals für diese Abweichung verantwortlich gemacht.

Die Aminosäurezusammensetzung zeigte folgendes Bild:

	Fr.I	II		Fr.I	II
Lys	4	5	Gly	5	5
His	1	2	Ala	4	3
Arg	2	2	Cys 1/2	5	6
Asp	7	7	Val	2	1
$CysSO_3H$	2	-	Met	-	1
Thr	4	4	Ile	3	3
Ser	5	5	Leu	3	3
Glu	5	4	Tyr	2	2
Pro	4	5	Phe	2	2
Anzahl der Aminosäuren	60			60	
Errechnetes MG	6 545			6545	

Bei der Auswertung unserer Aminosäureanalysen ergaben die errechneten ganzzahligen Werte stets das doppelte Molekulargewicht. Gelfiltrationsversuche, auch mit Inhibitor-Enzym-Komplexen, Molekulargewichtsbestimmungen mit der Ultrazentrifuge und Berechnung, basierend auf der spezifischen Aktivität, bestätigten dieses Ergebnis.
Als einzige aminoendständige Aminosäure ergab sich bei unseren Untersuchungen bei beiden Fraktionen nur Glycin. Bei Fraktion I hätte Trautschold noch Asparagin- bzw. Glutaminsäure gefunden.

3 ISOLIERUNG

3.1 Gewinnung des Rohextraktes

3.1.1 Adsorption des Inhibitors in den wäßrigen Extrakten an CM-Cellulose

Die Submandibularisdrüsen wurden tiefgekühlt von der Fa. Peele Freeze, Biologicals, bezogen. Nach dem Auftauen wurden sie sauber präpariert und in deionisiertem Eiswasser (2 l H_2O auf 100 g Gewebe) homogenisiert. 1 g frisches Drüsengewebe enthielt ca. 10 - 14 IU (Trypsinhemmung). Das Homogenat wurde unter Kühlung zentrifugiert, der Überstand auf einen pH-Wert von 6,0 bis 6,5 eingestellt und im Verhältnis 1 : 1 zur Drüsensubstanz mit CM-Cellulo-

se (H^+-Form) zwei Stunden lang im Eisbad gerührt.
Das CM-Cellulose-Adsorbat wurde dreimal mit 500 ml 0,01 M NaAc, pH 5,0 gewaschen. Zur Freisetzung des Inhibitors aus dem Adsorbat wurde 5%ige Kochsalzlösung in 0,01 M TRA/HCl-Puffer, pH 8,0 verwandt. Nach drei- bis viermaliger Elution ergab sich im Überstand eine Gesamtausbeute an Inhibitor von 90 - 95%.

3.1.2 Entsalzung

Die Hauptmenge an Salz wurde durch vierstündige Dialyse gegen deionisiertes Wasser (0 - 4°C) in gewöhnlichen Dialyseschläuchen abgetrennt. Nach anschließender Einengung im Rotationsverdampfer folgte die völlige Entsalzung mit Hilfe der Gelfiltration. Die Säulen wurden mit Sephadex G-50 medium gepackt, mit 5%iger Essigsäure äquilibriert und eluiert und die salzfreien Inhibitorlösungen lyophilisiert; Messungen ergaben eine spezifische Aktivität der lyophilisierten Chargen von 1,4 - 1,8 IU/mg (Trypsinhemmung). Die Verluste an Inhibitor betrugen bis dahin ca. 18%.
In früher durchgeführten Versuchen (26) war das Homogenat vor der Isolierung mit CM-Cellulose mit 3%iger Perchlorsäure versetzt worden, um nönermolekulare Proteine auszufällen. Der Überstand wurde mit 5 M K_2CO_3 neutralisiert und das dabei ausgefallene $KClO_4$ durch Filtration über Cellulosepulver entfernt.

3.2 Chromatographische Trennmethoden

Zur weiteren Reinigung und Auftrennung wurden unterschiedliche chromatographische Systeme angewandt:

a) Mit dem mit Perchlorsäure behandelten Inhibitormaterial wurde in folgenden Schritten verfahren:

a_1) Gradientenchromatographie mit CM-Cellulose unter folgenden Bedingungen:

Säulenmaße:	1,6 x 30 cm
Auftragsmenge:	100 - 140 mg Inhibitormaterial, in 1,0 ml Startpuffer gelöst
Elutionspuffer:	0,01 M TRA/HCl
Gradient:	0,0 - 0,3 M NaCl

Die Verteilung der Inhibitorfraktionen ist aus Tab.1 ersichtlich.

a_2) Gelfiltration über Biogel P2 (Säulenmaße: 5,0 x 30 cm), anschließend Lyophilisation. Als Elutionsmittel diente 0,01 M Essigsäure.

a_3) Rechromatographie an CM-Cellulose der aufgetrennten Inhibitorfraktion I' und II' (s. a_1). Die Bedingungen waren dieselben wie in a_1) angegeben, lediglich der Anstieg des NaCl-Gradienten war flacher.

a_4) Gelfiltration über Biogel P2 (gleiche Bedingungen wie in a_2)

angegeben), anschließend Lyopnilisation der eluierten Inhibitorfraktionen. Die Aminosäurezusammensetzung der Inhibitorfraktionen I' und II' ist ersichtlich aus Tab.2.

b) Zur weiteren Reinigung und Auftrennung des Innibitormaterials aus wäßrigen Extrakten wurden folgende Methoden angewandt:

b_1) Gradientenchromatographie über CM-Cellulose (s.Abb.1) mit denselben Bedingungen wie in a_1) angegeben, lediglich der Anstieg des NaCl-Gradienten wurde etwas steiler gewählt (0,05 M - 0,5 M NaCl, in Elutionspuffer gelöst). Unter diesen Bedingungen wurde das Innibitormaterial ebenfalls in zwei Inhibitorfraktionen aufgetrennt, diesmal Fraktion 2-I und 2-II benannt.

b_2) Zur Gewinnung von höchstgereinigtem Inhibitormaterial und zur Durchführung von exakteren Auftrennungen erschien uns die Methode der Gleichgewichtschromatographie erfolgversprechender. Es gelang uns auch, die Bedingungen dazu herauszufinden (s.Abb. 2). Nach der Auftrennung und Rechromatographie der einzelnen Fraktionen erhielten wir Inhibitorlösungen, die nach der Entsalzung analysenrein waren.

b_3) Ultrafiltration der Inhibitorfraktionen in AMICON-Zellen (Membran: UM-2). Bis zur vollständigen Entsalzung mußte die Innibitorlösung wiederholt mit deionisiertem Wasser verdünnt und konzentriert werden.

b_4) Gleichgewichtschromatographie über CM-Cellulose von Fraktion 2-I (s.Abb.3) und Fraktion 2-II (s.Abb.4).

b_5) Ultrafiltration von Fraktion A_2 (s.Abb.2), anschließend Rechromatographie von Fraktion A_2 unter denselben Bedingungen wie in Abb.3 angegeben. Die Säulenlänge wurde jedoch verdoppelt und die Tropfgeschwindigkeit auf die Hälfte verlangsamt. Damit wurde eine vollständige Trennung von Fraktion A_1 und A_2 erreicht (vgl.Abb.3, 3b).

b_6) Gelfiltration der rechromatographierten Innibitorfraktion A_2 (s.Abb.3) und von Innibitorfraktion C (s.Abb.4) über Sephadex G-50 medium mit 5%iger Essigsäure als Elutionsmittel, anschließend Lyophilisation der entsalzten Innibitorfraktionen.
Die Aminosäurezusammensetzung der Inhibitorfraktionen A_2 und C ist ersichtlich aus Tab.3.

3.3 Bestimmung der Enzymaktivität und der Enzymhemmung

3.3.1 Trypsin

Die Aktivität des Trypsin und dessen Hemmung wurde gemessen mit Nα-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid-HCl (BAPNA) als Substrat. Das Substrat BAPNA wird durch Trypsin hydrolytisch gespalten. Die Geschwin-

digkeit der Freisetzung von p-Nitroanilid wird am Photometer bei 405 nm gemessen (18,29,30).

Die Bestimmung wurde nach bekannten Methoden durchgeführt (29,30). 1 mU Inhibitor hemmt die Aktivität von etwa 1 µg Trypsin; in Anwendung kam ausschließlich Trypsin der Novo Industri A/S, Kopenhagen.

Die Aktivität einer Inhibitoreinheit (IU) vermindert die hydrolytische Spaltung von BAPNA um 1 µmol/min. Die Molarität der in den Titrationsversuchen verwandten Trypsinlösungen (Abb.5) wurde nach der Methode von Chase und Shaw (34) ermittelt und außerdem durch Hemmtests mit einer Inhibitorlösung bekannter Molarität (31), dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen (TKIR).

3.3.2 Chymotrypsin

Als Substrat wurde N-3-(Carboxypropionyl)-L-Phenylalanin-p-nitroanilid (CPPN) verwendet. Die Bestimmung erfolgte nach bekannten Methoden (30,42), wobei die Definitionen von Enzym- und Inhibitoreinheit den vorher beim Trypsin angegebenen entsprachen. Ausschließlich zur Verwendung kam α-Chymotrypsin vom Rind (Novo Industri A/S, 1 100 NF/mg). 1 mU entspricht etwa 20 µg α-Chymotrypsin.

Die Molarität der in den Titrationsversuchen verwandten Chymotrypsinlösungen wurde bestimmt durch Hemmtests mit einer Inhibitorlösung (TKIR) bekannter Molarität (31).

3.3.3 Plasmin

Als Substrat zur Messung von Aktivität und Hemmung des Plasmins wurde BAPNA verwendet. Die Versuchsbedingungen entsprachen bis auf die Zugabe von Lysin zum Puffer (0,05 M) denen schon beim Trypsin angegebenen (29,30). Die Extinktionszunahme am Photometer wurde 10 min lang beobachtet (30). Das verwendete Plasmin wurde von Schweinen gewonnen; es stammte ebenfalls von Novo Industri A/S (Batch 25-S 68, 2,08 Novo-Einheiten/mg). Zur Verwendung gelangte eine Stammlösung von 10 mg Plasmin, gelöst in 4,0 ml 0,0025 N HCl.

Die Molarität der in den Titrationsversuchen verwandten Plasminlösungen (Abb.6) wurde durch Hemmtests mit einer Inhibitorlösung (TKIR) bekannter Molarität ermittelt (31).

3.3.4 Subtilisin, Aspergillus Oryzae Protease, Pronase

Mit Azo-Casein (Pentex-P 6262, Fluka AG) als Substrat wurde die Aktivität von Pronase und auch deren Hemmung durch HSMI ermittelt. Gleichbleibende Mengen der Enzyme wurden mit ansteigenden Mengen des Inhibitors inkubiert (5 min bei 30°C) in 1,0 ml 0,1 M Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,6. Anschließend wurden 2,0 ml 2%iger Azo-Caseinlösung hinzugefügt und die Mischung 10 min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 3,0 ml 5%iger Trichloressigsäure wurde der Ablauf der enzymatischen Reaktion beendet.

Nach 30-minütigem Stehen bei Raumtemperatur wurde die Extinktion des Überstandes am Photometer bei einer Wellenlänge von 366 nm ab-

gelesen. Eine ausführliche Beschreibung der Versuchsbedingungen findet sich in (30, S. 1029).
Die einzelnen Enzyme stammen von folgenden Firmen:
Subtilisin: Kristalline Bakterienprotease, 22,0 Anson Trypsin Einheiten pro mg, Batch 50-2 von Novo Industri A/S.
Pronase E: Lyophil., 70 000 PUK/G aus Streptomyces griseus von der Fa. Merck AG.
Aspergillus Oryzae Protease: Alkalisch, hochgereinigt, 3 500 PU (pH 8,0) pro mg Protein von Röhm und Haas GmbH, Darmstadt.

3.3.5 Elastase

Die Aktivität der Elastase (gewonnen aus Schweinepankreas, krist. Suspension, 15 E/mg von der Fa. Merck AG) wurde gemessen an Hand der Methode von Sachar et al. (35). Als Substrat wurde Elastin-Orcein verwendet. Die Hemmung der Elastase durch HSMI wurde auf folgende Weise ermittelt:
Eine Mischung von 0,15 ml der Elastasesuspension (sie enthielt 0,75 mg Elastase in 0,2 M TRIS/HCl, pH 8,8) und der Inhibitorlösung wurde mit 0,2 M TRIS/HCl, pH 8,8 auf 1,5 ml aufgefüllt. Diese Mischung wurde 5 Min. durchgeschüttelt und dann 20 mg Elastin-Orcein dazugegeben, anschließend 30 Min. bei Raumtemperatur stark geschüttelt. Durch Zugabe von 2,0 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,0 wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Nach Abzentrifugieren wurde die Extinktion des Überstandes am Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Isolierung

Die Entwicklung von einfacheren Isolierungsmethoden für den HSMI als die früher angewandten (s. 23,25,26,27,36) erwies sich als unumgänglich, da wir nur dadurch genügend Substanz zur Aufklärung der Aminosäuresequenz gewinnen konnten (37).

Die im vorigen Abschnitt beschriebene Methode der Isolierung kommt mit wenigen Schritten aus; mehrmalige Chromatographie über CM-Cellulose, Gelfiltration über Sephadex G-50 medium oder Ultrafiltration in AMICON-Zellen, wobei bei jedem dieser Schritte nur geringe Verluste an Inhibitoraktivität zu beobachten waren.
Die mit Perchlorsäure behandelten Drüsenextrakte erbrachten bei der Gradientenchromatographie zwei Inhibitorfraktionen, die sich mengenmäßig etwa gleich vernielten (Tab.1,1c). Beide Fraktionen unterschieden sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung nur geringfügig: Fraktion I' enthielt einen Glutaminsäurerest mehr und einen Lysinrest weniger als Fraktion II' (Tab.2).

Die Gradientenchromatographie wurde auch bei dem aus wässrigen Extrakten gewonnenen Inhibitormaterial verwendet (Abb.1). Im Eluat erschien zunächst eine Inhibitorfraktion I (bezeichnet

mit 2-I), die mengenmäßig doppelt soviel an Inhibitoraktivität enthielt wie die Fraktion II (bezeichnet mit 2-II, vgl. Tab.1, 1[d]). Beide Fraktionen waren nicht einheitlich, wie sich bei der späteren Gleichgewichtschromatographie herausstellte (Abb. 3 und 4).

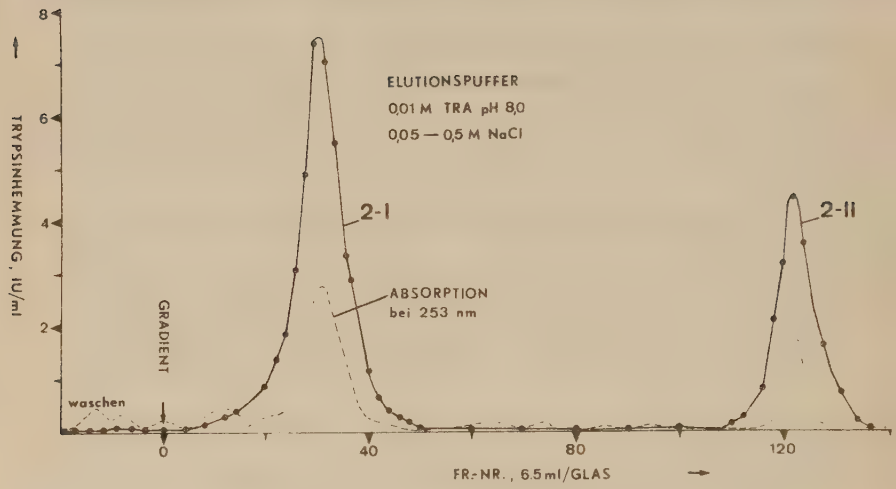

Abb. 1 : Gradientenchromatographie über CM-Cellulose

Säulenmaße: 4,0 x 45 cm
Auftragsmenge: 600 mg Inhibitormaterial, in 10 ml Startpuffer gelöst.

Die CM-Cellulose wurde mit 0,01 M TRA/HCl, pH 8,0 äqilibriert. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 1 Tr/min/cm^2. Sobald der Proteingehalt und die Inhibitoraktivität im Eluat abnahm, wurde mit einem linearen Gradienten eluiert. Wir benützten dazu zwei Gefäße mit je 0,5 l Puffer (0,01 M TRA/HCl, pH 8,0 und 0,05 M NaCl). Im zweiten Gefäß befand sich 0,5 M NaCl. Eine Übersicht über die Verteilung der aufgetrennten Fraktionen gibt die Tab. 1.

Tab.1 Verteilung der Inhibitoraktivität auf die einzelnen Fraktionen
Wichtige Zwischenfraktionen sind in Klammern angegeben

Abb.	Anzahl der Versuche	Verteilung der Inhibitoraktivität (Trypsinhemmung) in den einzelnen Fraktionen in %[a]				Gesamtausbeute[b] in %[a]
		G R A D I E N T E N C H R O M A T O G R A P H I E				
		I (2-I)		II (2-II)		
1[c]	3	32-38[h]	(10-12)	26-28[h]	(12-15)	97-100
1[d]	3	45-51	(9-25)	22-29	(4-8)	94-100
		G L E I C H G E W I C H T S C H R O M A T O G R A P H I E				
		A_1	A_2	B	C	
2	1	14	50	7	28	99
3[e]	3	17-27	53-71			87-97
3[f]	3	1-2	87-99[h]			95-100
4[g]	1		8	27	54[h]	95

a Bezogen auf die in der Auftragsmenge enthaltene Inhibitoraktivität
b Einschließlich aller Fraktionen, die Inhibitoraktivität enthielten
c Auftrennung des mit Perchlorsäure behandelten Inhibitormaterials (s.Methoden)
d Auftrennung des Inhibitormaterials aus den wäßrigen Extrakten (s.Methoden)
e Auftrennung von Fraktion I (von 1[d]) auf der kurzen Säule (s.Abb.3)
f Auftrennung von Fraktion I (von 1[d]) und Rechromatographie von Fraktion A_2 (von 3[e]) auf der langen Säule (s.Abb.3)
g Auftrennung von Fraktion II (von 1[d])
h Diese Inhibitorfraktionen wurden nach Entsalzung über Sephadex G-50 (Elutionsmittel: 5%ige Essigsäure) und Lyophilisation für weitere Untersuchungen benützt

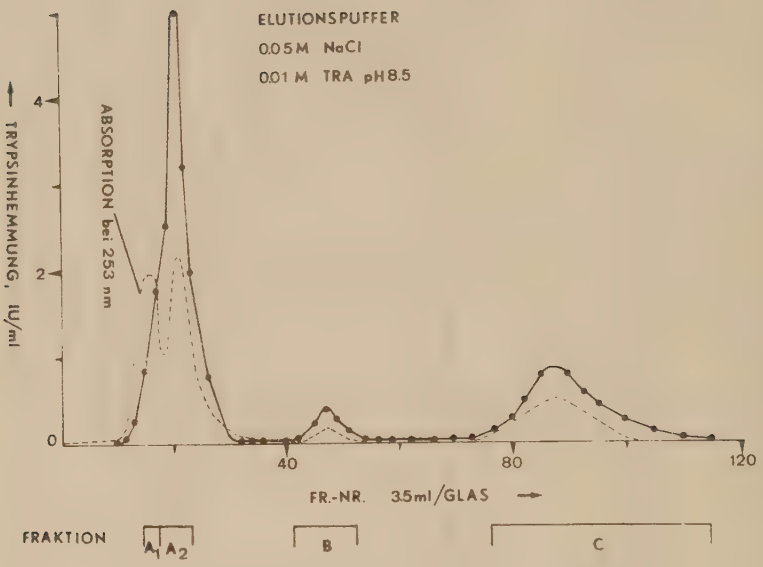

Abb. 2 Gleichgewichtschromatographie des Inhibitormaterials aus wäßrigen Extrakten über CM-Cellulose

Säulenmaße:	2,0 x 30 cm
Elutionspuffer:	0,01 M TRA/HCl, pH 8,5 + 0,05 M NaCl
Auftragsmenge:	100 - 150 mg (gelöst in 5,0 ml Elutionspuffer)
Tropfgeschw.:	12 ml/h, 2 Tr/min/cm^2

Die Verteilung der Inhibitoraktivität auf die einzelnen Fraktionen und die Gesamtausbeute sind in Tab. 1 wiedergegeben.

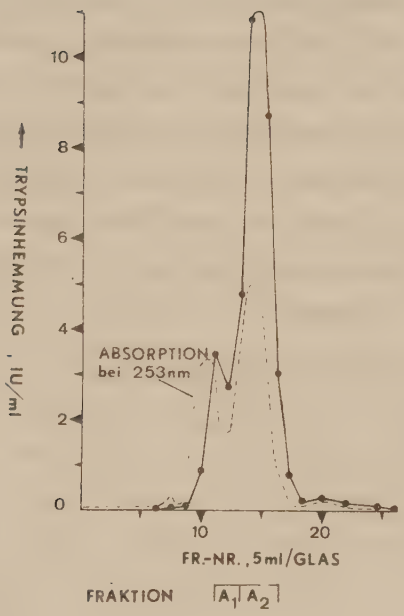

Abb.3 Gleichgewichtschromatographie von Fraktion 2-I, erhalten aus der vorangegangenen Gradientenchromatographie

Die Bedingungen waren dieselben wie in Abb.2, ausgenommen die Säulenmaße.

3a) Auftragsmenge: 228 IU (Trypsinhemmung)
Säulenmaße: 2,0 x 30 cm
Tropfgeschwindigkeit: 12 ml/h, 2 Tr./min/cm^2
Die Elutionskurve ist aus der Abbildung ersichtlich.

3b) Durch Verdoppelung der Säulenlänge (2,0 x 65 cm) und Verminderung der Tropfgeschwindigkeit um die Hälfte (6 ml/h) konnte eine vollständige Trennung von Fraktion A_1 und A_2 erreicht werden. Die Verteilung der inhibitorischen Aktivität und der Elutionsvolumina in den einzelnen Fraktionen ist in Tab.1 wiedergegeben.

Die Methode der Auftrennung mittels Gradientenchromatographie brachte ein für unsere Zwecke noch nicht ganz befriedigendes Ergebnis. Für die weiteren Untersuchungen war ein höherer Reinheitsgrad des Inhibitormaterials sehr wünschenswert. Bei der Suche nach einer neuen Möglichkeit zur Auftrennung des Inhibitormaterials konnten wir die Bedingungen für eine Gleichgewichtschromatographie herausfinden. Sie wurde ebenfalls an CM-Cellulose durchgeführt (s. Abb.2).

Die Gleichgewichtschromatographie oder Elution unter Startbedingungen hat sich als eine sehr leistungsfähige Methode bei der Chromatographie von Polyelektrolyten erwiesen. sie läßt sich zur Trennung von Komponenten eines Gemisches verwenden, die sich im chromatographischen Verhalten sehr ähnlich sind. Für das Äquilibrieren der Säule, das Auftragen der Probenmischung und während der gesamten Elution wird der gleiche Puffer verwendet. Ionenstärke und pH-Wert des Puffers werden dabei so gewählt, daß die relevanten Komponenten der Probe nur relativ schwach vom Ionenaustauscher adsorbiert werden, sodaß sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen gelöster und adsorbierter Substanz ausbilden kann. Durch die sehr große Zahl der Desorptions- und Adsorptionsschritte, denen die Substanzen beim Durchgang durch die Säule unterliegen, resultiert schon bei geringen Unterschieden in der Adsorptionstendenz der verschiedenen Komponenten eines Gemisches im Endeffekt eine deutliche Trennung. Von Wichtigkeit für die Auftrennung ist deshalb noch die Säulenlänge (Addition der Adsorptions-

effekte) und in geringerem Maß auch die Fließgeschwindigkeit (vgl. Abb.3). Sie muß genügend langsam sein, damit das Verteilungsgleichgewicht auch erreicht wird.
Mit der Methode der Gleichgewichtschromatographie konnte dann auch ein weiterer Reinigungseffekt erzielt werden. Fraktion I und Fraktion II erwiesen sich als noch nicht einheitlich und bei der Auftrennung erschien zwischen den beiden bekannten Fraktionen noch eine dritte im Eluat, Fraktion B benannt.

Eine Übersicht über die Verteilung der Inhibitorfraktionen gibt die Abb.2 und Tab.1. Der Anteil der Hauptfraktionen A_2 und C (sie sind identisch mit den in Abb.3 und 4 gezeigten Inhibitorfraktionen) beläuft sich auf 92% der Gesamtinhibitoraktivität (vgl. Tab.1; die Inhibitoraktivität von Fraktion A_1 muß man Fraktion A_2 zurechnen, siehe auch 3^e und 3^f in Tab.1 und Abb. 3). Fraktion B ist noch nicht näher untersucht.
Während der Isolierungs- und Auftrennungsversuche mit dem Inhibitormaterial aus wäßrigen Extrakten waren keinerlei nennenswerte Einbußen durch enzymatische Einwirkung oder auch andere Einflüsse zu beobachten.
Im Gegensatz dazu wurde bei den mit Perchlorsäure behandelten Extrakten ein Teil des Inhibitors an die gefällten Proteine absorbiert und konnte erst durch wiederholte Extraktionen abgelöst werden. Mit Hilfe der Gleichgewichtschromatographie konnte das Inhibitormaterial ohne großen Aufwand exakt aufgetrennt und von

noch vorhandenen Verunreinigungen gereinigt werden. Die Verluste an inhibitorischer Aktivität waren gering.
Diese Methode war auch die gegebene zur Rechromatographie der aus der Gradientenchromatographie erhaltenen Fraktionen 2-I (Abb.3) und 2-II (Abb.4). Sie brachte folgende Ergebnisse:

1) Nach vollständiger Abtrennung von A_1, einer inhibitorisch inaktiven Verunreinigung von Fraktion 2-I (s.Legende zu Abb.3 und Tab.1, 3^e und 3^f) erhielten wir eine Inhibitorfraktion, bezeichnet mit A_2. Diese wies dieselbe Aminosäurezusammensetzung auf wie die aus den mit Perchlorsäure behandelten Extrakten gewonnene Fraktion I' (vgl. Tab.3).

2) Bei Inhibitorfraktion C (vgl. Abb.4 und Tab.1, 4g), durch Gleichgewichtschromatographie aus Fraktion 2-II erhalten, fehlte im Vergleich zur Inhibitorfraktion A_2 jeweils ein Prolin- und ein Glycinrest. Wahrscheinlich sind Glycin und Prolin in den wäßrigen Drüsenextrakten von Exopeptidasen abgespalten worden. Ein Glycinrest wurde auch von H. Tschesche und E. Fink als die einzige N-terminale Aminosäure bestimmt. Hingegen weist sowohl Fraktion C einen Glutaminsäurerest weniger auf als auch die Inhibitorfraktion II', die aus den mit Perchlorsäure behandelten Extrakten stammte.
Daher ist die Annahme naheliegend, daß die Mundspeicheldrüsen des Hundes zwei fast gleiche Inhibitoren enthalten, die sich nur in zwei Aminosäureresten unterscheiden, einem Glutaminsäure-

rest und einem Lysinrest. Einer der beiden Inhibitoren könnte möglicherweise infolge einer Mutation diese geringfügige Änderung in der Aminosäurezusammensetzung erfahren haben. Dieses einheitliche Bild in der Aminosäurezusammensetzung ist umso erstaunlicher, wenn man bedenkt, daß das gesamte Drüsenmaterial von vielen verschiedenen Hunderassen stammt. Das Vorkommen von Isoinhibitoren wurde auch schon von anderen Autoren beschrieben (38-41, 32,43).

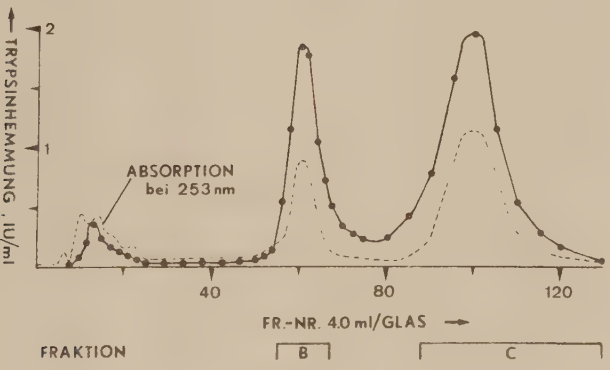

Abb.4 Gleichgewichtschromatographie von Fraktion 2-II, erhalten aus der vorangegangenen Gradientenchromatographie

Die Bedingungen waren dieselben wie in Abb.2.

Auftragsmenge: 255 IU (Trypsinhemmung)
Die Verteilung der Inhibitoraktivität ist aus Tab.1 ersichtlich.

4.2 Aminosäurezusammensetzung

Zur Durchführung der Aminosäureanalysen wurde jeweils 1 mg des gewonnenen Inhibitormaterials in 2,0 ml 6 N HCl unter Vakuum bei 110° C hydrolysiert. Die Hydrolysezeiten betrugen 20, 70 und teilweise 120 Stunden. Die Säure wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck (11-15 mm Hg) entfernt. Die Aminosäureanalysen der Hydrolysate wurde nach der Methode von Spackman, Stein und Moore (69) mit einem Beckman-Aminosäureanalysator durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels eines Infotronic-Integrators.

Die Aminosäurezusammensetzung der isolierten Inhibitorfraktionen sind ersichtlich aus den Tabellen 2 und 3. Auf die geringfügigen Unterschiede in der Anzahl der Glutaminsäure-, Glycin-, Lysin- und Prolinreste wurde im vorangehenden Abschnitt schon hingewiesen, folgender Umstand sollte jedoch noch erwähnt werden. Legt man das Molekulargewicht zugrunde, entspricht die Anzahl der Disulfidbrücken etwa den Werten, wie sie schon bei vielen anderen aus tierischem Material gewonnenen Inhibitoren gefunden wurden (z.B. von Inhibitoren aus Pankreasdrüsen, Rinderorganen, Samenblasen usw.).

Die Freisetzung von Arginin und Isoleucin ist erst nach der 70-Stunden-Hydrolyse beendet. Die Werte von Tryptophan und Prolin bedürfen noch einer Bestätigung bei der Untersuchung der Aminosäuresequenz, da methodische Schwierigkeiten präzise Messungen

Tab.2 Aminosäurezusammensetzung (AS/mol) der HSMI-Fraktionen I' und II' (isoliert aus den mit Perchlorsäure behandelten Extrakten, aufgetrennt mittels Gradientenchromatographie)

Fraktion	I' (Abb.1, Tab.1)				II' (Abb.1, Tab.1)			
	gefunden		interpoliert		gefunden		interpoliert	
Hydrolyse-zeit	20 h	70 h	i	AS/mol	20 h	70 h	i	AS/mol
$CysSO_3H$	12,06[a]			(12)	12,19[a]			(12)
$MetO_2$	3,16[a]			(3)	2,84[a]			(3)
Asp	13,33	13,18		13	13,17	13,09		13
Thr	6,71	6,59	6,78	7	6,70	6,45	6,82	7
Ser	7,81	6,99	8,05	8	7,64	6,79	7,95	8
Glu	8,88	9,33		9	8,02	8,16		8
Pro	5,87	6,03		6	5,84	6,27		6
Gly	8,91	9,24		9	8,79	9,09		9
Ala	6,07	6,19		6	5,86	6,14		6
Cys	10,56	10,10		12[b]	11,60	9,87		12[b]
Val	2,66	4,00		4	2,74	3,74[c]	4,13	4
Met	2,28	2,90		3[b]	2,22	2,47		3[b]
Ile	4,33	5,27		5	4,45	5,24[d]		5
Leu	5,96	6,23		6	5,82	6,18		6
Tyr	4,95	4,54	5,10	5	4,93	4,25	5,20	5
Phe	3,96	4,09	3,92	4	3,86	4,00		4
Lys	9,90	9,87	9,93	10	10,91	10,89	10,93	11
His	3,08	3,08		3	2,80	3,04		3
Arg	4,84	5,17		5	4,69	4,84	4,91	5
Trp[e]	0,3			0	0,4			0
Summe				115				115
Molekular-gewicht[f]				12750				12750

a Nach Oxydation mit Perameisensäure
b Berechnet aus den Werten des oxydierten Inhibitors (vgl.[a])
c Wert der 120 h-Hydrolyse: 3,89
d Wert der 120 h-Hydrolyse: 5,06
e Spektrophotometrisch bestimmt (48)
f Die Werte ergeben sich, wenn keine Amidierung vorliegt
i Interpolationswerte unter Berücksichtigung des Abbaus bzw. der Freisetzung dieser Aminosäuren während der Hydrolyse

Tab.3 Aminosäurezusammensetzung (AS/mol) der HSMI-Fraktionen A_2 und C (isoliert aus wäßrigen Extrakten, aufgetrennt mittels Gleichgewichtschromatographie)

Fraktion	A_2 (Abb.3, Tab.1)				C (Abb.4, Tab.1)			
Hydrolysezeit	GEFUNDEN		INTERPOLIERT		GEFUNDEN		INTERPOLIERT	
	20 h	70 h	i	AS/mol	20 h	70 h	i	AS/mol
$CysSO_3H$	11,68[a]			(12)	11,75[a]			(12)
$MetO_2$	2,90[a]			(3)	2,98[a]			(3)
Asp	13,13	13,17		13	13,22	13,18		13
Thr	6,95	6,74	7,25	7	6,96	6,80	7,00	7
Ser	7,90	7,06	8,20	8	7,78	7,53	8,05	8
Glu	9,05	8,92		9	8,12	8,34		8
Pro	6,19	5,92		6	4,86	5,05		5
Gly	8,99	8,97		9	8,25	8,43		8
Ala	5,99	5,97		6	5,98	6,15		6
Cys	11,41	9,89		12[b]	10,59	10,99		12[b]
Val	2,75	3,82	4,20	4	2,90	3,84	4,20	4
Met				3[b]				3[b]
Ile	4,64	5,12	5,32	5	4,90	5,08	5,12	5
Leu	6,15	6,17	6,19	6	6,03	6,15	6,18	6
Tyr	4,82	4,46	5,00	5	4,68	4,53	4,72	5
Phe	3,85	3,93	3,80	4	3,75	4,02		4
Lys	9,97	10,08	9,95	10	11,10	11,30	11,00	11
His	3,06	3.09		3	2.98	3.09		3
Arg	4,88	4,98	5,00	5	4,57	4,02	5,15	5
Trp[c]	0,35			0				
Summe				115				113
Molekular-gewicht				12750				12595

[a] Nach Oxydation mit Perameisensäure
[b] Berechnet aus den Werten des oxydierten Inhibitors
[c] Spektrophotometrisch bestimmt (48)
[d] Die Werte ergeben sich, wenn keine Amidierung vorliegt
i Interpolationswerte unter Berücksichtigung des Abbaus bzw. der Freisetzung dieser Aminosäuren während der Hydrolyse

Tab.4 Molekulargewichtsbestimmung von HSMI und HSMI-Enzymkomplexen mittels Gelfiltration (49,50)

Verwendete Substanzen	V/V_0	MG
Dextranblau	(V_0)	
Humanalbumin	1,27	68 000
Chymotrypsinogen	1,57	25 000
Cytochrom C	1,86	12 000
BPTI	2,30	6 500
HSMI	1,86[a]	12 000
HSMI + Trypsin	1,52	29 000[b]
HSMI + Chymotrypsin	1,42	39 000
HSMI + Trypsin + Chymotrypsin	1,30	60 000

[a] Im Eluat wurde der Inhibitor immer an derselben Stelle gefunden, sowohl bei Messung der inhibitorischen Aktivität gegen Trypsin als auch gegen Chymotrypsin.

[b] Auch bei anderen Inhibitoren hatte sich gezeigt, daß bei Anwendung dieser Methode das Molekulargewicht der Komplexe niedriger als erwartet ausfiel (46).

Die Versuche wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säulenmaße: 115 x 2,0 cm
Säulenfüllung: Sephadex G-75, gekühlte Säule (10°C)
Puffer: 0,05 M TRA-HCl + 0,15 M NaCl, pH 7,0

Die Auftragsmenge betrug bei jeder der verwendeten Substanzen 3 mg. Die Komplexe wurden aus äquimolaren Mengen des jeweiligen Enzyms und des Inhibitors gebildet. Gemessen wurde sowohl die Absorption (bei 253 nm) als auch die Hemmung der Enzymaktivität im Eluat. Durch Behandlung mit 6%iger Perchlorsäure wurde der Komplex dissoziiert und damit das Enzym ausgefällt.

nicht zuließen. Aminozuckerreste (Glukosamin, Galaktosamin) wurden im Lauf der Untersuchungen nicht gefunden. Als einzige aminoendständige Aminosäure ergab sich bei beiden Fraktionen Glycin.

4.3 Molekulargewicht

Zur Ermittlung des MG wurden verschiedene Methoden angewandt; bei allen Versuchen fand die Fraktion A_2 Verwendung. Es ergaben sich folgende Werte:

1) Aus der AS-Zusammensetzung (Tab.3)	12 750
2) Aus Gelfiltrationsversuchen (Tab.4)	12 000
3) Aus Versuchen mit der Ultrazentrifuge (45)	11 900
4) Aus Berechnungen, denen eine spezifische Aktivität von 2,5 IU/mg (Trypsinhemmung) zugrunde lag	13 200

Diese mit verschiedenen Methoden gewonnenen Werte stimmen weitgehend überein. Sie decken sich auch mit den Werten, die schon in früheren Arbeiten erwähnt wurden (36,23,46,47). HSMI bildet mit Trypsin und Chymotrypsin zusammen einen ternären Komplex (Tab.4). Man kann deshalb ausschließen, daß HSMI während der Komplexbildung in Untereinheiten dissoziiert. Eine weitere Bestätigung unserer MG-Berechnungen ergibt sich aus den Aminosäureanalysen.

Bei Beobachtungen an Inhibitormaterial von HSMI, das noch nicht diesen hohen Reinheitsgrad besaß wie unsere Substanzen, vermutete man, daß HSMI möglicherweise z w e i Trypsinmoleküle binden konnte. Auf Grund der spezifischen Aktivität, die im Lauf früherer Arbeiten (26,27,36,23) gefunden wurde, konnte man zu diesem Schluß kommen; es ist denkbar, daß in diesem Zustand das reaktive Zentrum des Inhibitors statt Chymotrypsin ein zusätzliches Trypsinmolekül binden kann. Bei unseren Untersuchungen mit hochgereinigtem Inhibitormaterial konnten wir jedoch nicht beobachten, daß ein HSMI-Molekül zwei Trypsinmoleküle binden kann.

4.4 Hemmspektrum

Folgende Proteinasen werden von HSMI stark gehemmt: T r y p s i n und α- C h y m o t r y p s i n (Abb.7), (beide Enzyme wurden von Rindern gewonnen), S u b t i l i s i n NOVO (Abb.8), E l a s t a s e , gewonnen aus Schweinepankreas (Abb.9) und die alkalische A s p e r g i l l u s O r y z a e P r o t e a s e (Abb.10). Mit all diesen Enzymen bildet unter den angegebenen Bedingungen jeweils e i n einziges Inhibitormolekül mit e i n e m Enzymmolekül den Enzym-Inhibitor-Komplex. Die Schlußfolgerung fußt auf den in Tab.5 angegebenen Werten und auf dem Verlauf der Hemmkurven. Letzteres trifft vor allem auf die Elastase zu.

An Hand der Hemmkurven ist es auch möglich, die Anzahl der aktiven Enzymmoleküle zu berechnen, die in den verwendeten Enzympräparaten vorhanden sind, z.B. bei Subtilisin NOVO, Aspergillus Oryzae Protease und Elastase (vgl. Tab.5). Bemerkenswert war die Tatsache, daß die Aktivität von Subtilisin und Elastase auch bei Zugabe von großen Mengen TKIR (0,3 - 0,5 mg) unter denselben Versuchsbedingungen nicht abnahm.

In P r o n a s e sind Proteinasen enthalten, die durch HSMI stark gehemmt werden. Etwa ein Drittel der proteolytischen Aktivität von Pronase (verwendetes Substrat: Azo-Casein) wird durch HSMI gehemmt und zwar in einer für eine 1 : 1-Komplexbildung charakteristischen Weise (Abb.11). Daraus ließ sich dann berechnen, daß 1 mg der verwendeten Pronase 14 nMol an Proteinasen enthält, die von HSMI gehemmt werden.

P l a s m i n aus Schweinepankreas wird von HSMI ebenfalls gehemmt, aber wesentlich schwächer als die eben erwähnten Enzyme. Denn bereits Zugabe von BAPNA, das nur eine geringe Affinität zu Plasmin hat, bewirkt eine starke Dissoziation des Plasmin-Inhibitor-Komplexes. Der steile Beginn der Hemmkurve dürfte zurückzuführen sein auf geringe Trypsinbeimengungen zum Plasmin (bei der Herstellung von Plasmin wird zur Aktivierung des Plasminogens Trypsin hinzugegeben).

K o l l a g e n a s e wurde von HSMI nicht gehemmt. Die Aktivität von 0,1 mg Kollagenase (Worthington: 159 U/mg; Substrat:

p-Phenyl-Azobenzylcarbonyl-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Pro-D-Arg-OH von Fluka. Die Messungen wurden nach der Methode von Wünsch und Heidrich (33) vorgenommen) wurde weder durch Zugabe von 0,1 mg HSMI noch von 0,5 mg TKIR vermindert.

Haendle berichtet, daß auch K a l l i k r e i n aus Schweinepankreas von HSMI nicht gehemmt wird (27).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß HSMI einen starken Hemmstoff für Serinproteasen darstellt, die verschiedenen Familien dieser Gruppe angehören (51). Zusätzlich zu den Proteinasen, die zur Trypsin-Chymotrypsin-Familie der Säuger gehören, hemmt HSMI auch noch Serinproteinasen von Bakterien und Schimmelpilzen; diese besitzen in ihrer Struktur keinerlei Ähnlichkeit mit den oben erwähnten Enzymen. Interessant erscheint auch die Tatsache, daß das Hemmspektrum der aus Eiern (38) und aus Kartoffeln gewonnenen Inhibitoren (52,53) dem des HSMI ziemlich ähnlich ist.

Tab.5 Molares Verhältnis Enzym : Inhibitor in den einzelnen Komplexen
Die Werte wurden aus den Hemmkurven errechnet

Enzym	Abb.	Substrat	Enzymmenge nMol	Enzymmenge µg	Errechnete Menge an Inhibitor, die für eine vollständige Hemmung nötig ist, in nMol
Trypsin	5	BAPNA	0,28		0,26
Chymotrypsin	7	CPPN	0,78		0,78
Subtilisin	8	Azo-Casein		25[a]	0,80
Elastase	9	Elastin-Orcein		750[b]	0,80
A.Oryzae Protease	10	Azo-Casein		25[c]	0,58
Pronase	11	Azo-Casein		50[d]	0,70

[a] Bei einem MG von 27 500 (54) enthält das Subtilisinpräparat 22 µg aktives Enzym
[b] Bei einem MG von 28 500 (54) enthält die Elastase 23 µg aktives Enzym
[c] Bei einem MG von 19 600 (54) enthält die A. Oryzae Protease 11 µg aktives Enzym
[d] Bei einem MG von 19 000 (55) enthält das Pronasepräparat 13 µg eines Enzyms, dessen Aktivität durch HSMI gehemmt wird

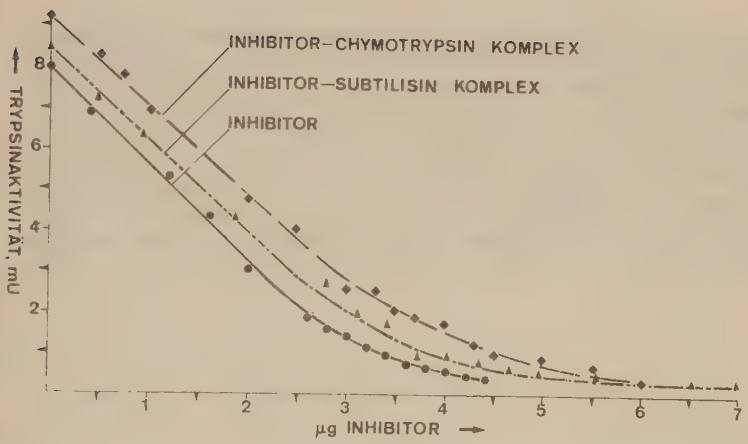

Abb.5 Abhängigkeit der Hemmung von Trypsin von der Konzentration an Inhibitor bzw. Inhibitor-Enzym-Komplexen (Hemmkurven)

Ordinate: Restaktivität (mU) der eingesetzten konstanten Menge Trypsin nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an Inhibitor bzw. Inhibitor-Enzym-Komplexen (s.Abszisse)

Abszisse: Zugegebene Menge an Inhibitor (µg). Zur Verwendung kam ausschließlich die Inhibitorfraktion A_2.

1) Hemmkurve mit HSMI: Gleichbleibende Mengen an Trypsin, mit TKIR titriert, (0,28 nMol = 10 µg) wurden mit ansteigenden Inhibitorkonzentrationen in 2,0 ml 0,2 M TRA-HCl, pH 7,8 (ohne $CaCl_2$) 8 min. bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,0 ml Substratlösung (1 mg BAPNA, gelöst in deionisiertem Wasser, vgl.auch 11,12) begann die enzymatische Reaktion abzulaufen. Bei 90%iger Hemmung von Trypsin durch HSMI ergab sich bei Inkubationszeiten von 1 - 15 min. keine zeitabhängige Abnahme des Hemmgrades.

') Hemmkurve des HSMI-Chymotrypsin-Komplexes: Äquimolare Mengen von HSMI (120 µg) und α-Chymotrypsin (etwa 240 µg), berechnet aus den Werten der Hemmkurve in Abb.7 bei 50%iger Hemmung, wurden in 0,5 ml 0,2 M TRA-HCl, pH 7,8 mindestens 15 min. inkubiert. Zur Ermittlung der Hemmkurve wurden gleichbleibende Mengen an Trypsin (0,32 nMol) mit ansteigenden Konzentrationen des HSMI-Chymotrypsin-Komplexes in 2,0 ml TRA-HCl, pH 7,8 bei 25°C 8 min inkubiert. Der Ablauf der enzymatischen Reaktion wurde wie oben gestartet. Bei Inkubationszeiten von 1 - 15 min. ergab sich ebenfalls keine zeitabhängige Abnahme der Hemmung von Trypsin durch den HSMI-Chymotrypsin-Komplex.

3) Hemmkurve des HSMI-Subtilisin-Komplexes: Äquimolare Mengen vom HSMI (103 µg) und Subtilisin (etwa 240 µg), berechnet aus den Werten der Hemmkurve in Abb.8 bei 50%iger Hemmung, wurden mindestens 10 min. in 2,24 ml Phosphatpuffer, pH 7,6 bei 0°C inkubiert. Gleichbleibende Mengen Trypsin (0,30 nMol) wurden mit ansteigenden Mengen des HSMI-Subtilisin-Komplexes in 2,0 ml 0,2 M TRA-HCl, pH 7,8 bei 25°C 8 min. inkubiert. Nach Zugabe von BAPNA begann die enzymatische Reaktion abzulaufen (vgl. Methoden). Die bei unseren Versuchen benutzte Menge an Subtilisin zeigte keine hydrolytische Spaltung von BAPNA.

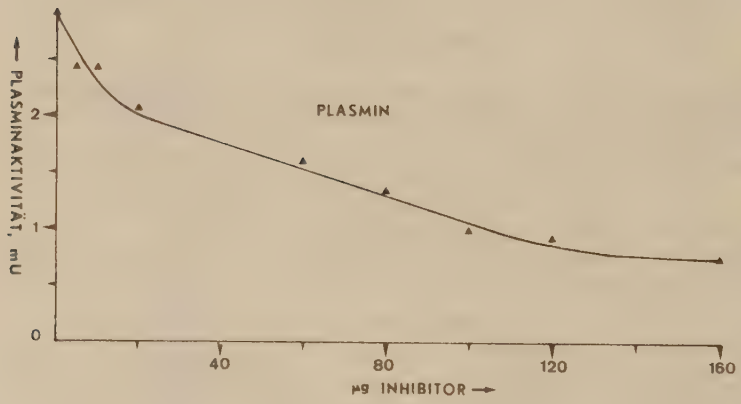

Abb.6 Hemmkurve von Plasmin

Gleichbleibende Mengen (250 µg, 1,8 nMol) Plasminlösung wurden mit ansteigenden Mengen HSMI (Fr.A_2, vgl.Abb.5) in 2,0 ml 0,2 M TRA-HCl, 0,05 M Lysin, pH 7,8 bei 25°C 8 min. inkubiert. Nach Zugabe von 1,0 ml BAPNA (vgl.Methoden und Abb.5) begann die enzymatische Reaktion abzulaufen. Bei Inkubationszeiten von 1 - 15 min. (bei 71%iger Hemmung von Plasmin durch HSMI) ergab sich keine Abnahme des Hemmgrades.

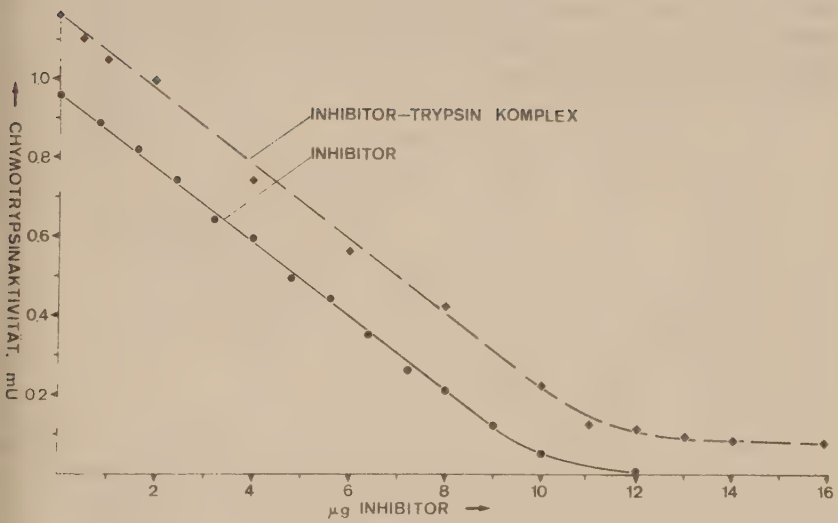

Abb.7 Hemmkurve von α-Chymotrypsin (aus Rinderorganen gewonnen) mit HSMI und HSMI-Trypsin-Komplex

Zur Verwendung kam ausschließlich Fraktion A_2 (vgl. Abb. 3 und Tab.1)

1) Hemmkurve mit HSMI: Gleichbleibende Mengen α-Chymotrypsin, 0,78 nMol (20 µg), mit TKIR titriert, wurden mit ansteigenden Mengen HSMI in 2,0 ml 0,2 M TRA-HCl, 0,02 M $CaCl_2$, pH 7,8 bei 25°C 8 min. inkubiert. Nach Zugabe von 1,0 ml Substrat (5 mg CPPN in 1,0 ml 0,2 M TRA-HCl, pH 7,8 (30, 42)) begann die enzymatische Reaktion abzulaufen. Bei Inkubationszeiten von 1 - 15 min. war bei 90%iger Hemmung von α-Chymotrypsin durch HSMI keine Abnahme des Hemmgrades zu beobachten.
2) Hemmkurve des HSMI-Trypsin-Komplexes: Äquimolare Mengen von HSMI (80 µg) und Trypsin (etwa 200 µg), berechnet aus der Hemmkurve in Abb.5 bei 50%iger Hemmung, wurden in 6,0 ml

0,2 M TRA-HCl, 0,02 M $CaCl_2$, pH 7,8 mindestens 10 min. bei 0°C inkubiert. Gleichbleibende Mengen α-Chymotrypsin (0,96 nMol) wurden mit ansteigenden Mengen des HSMI-Trypsin-Komplexes bei 25°C 8 min. inkubiert. Nach Zugabe von 1,0 ml Substrat (s.oben) begann die enzymatische Reaktion abzulaufen. Messungen bei 90%iger Hemmung von α-Chymotrypsin durch HSMI ergaben bei Inkubationszeiten von 1 - 15 min. keine Abnahme des Hemmgrades.

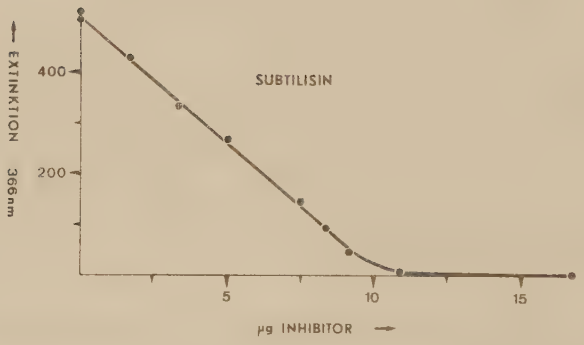

Abb.8 Hemmkurve von Subtilisin NOVO

Zu gleichbleibenden Mengen von Subtilisin (25 µg) wurden ansteigende Mengen HSMI (Fraktion A_2, vgl.Abb.5) hinzugefügt. Verwendetes Substrat: Azo-Casein

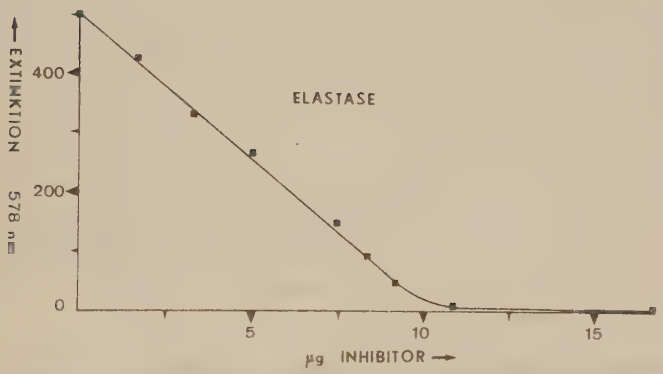

Abb.9 Hemmkurve der Elastase (gewonnen aus Schweinepankreas)

Zu gleichbleibenden Mengen der Elastase (0,75 mg) wurden ansteigende Mengen Inhibitor (Fraktion A_2, vgl.Abb.5) hinzugegeben. Verwendetes Substrat: Elastin-Orcein. Die Versuchsbedingungen sind im Einzelnen im Abschnitt Methoden wiedergegeben.

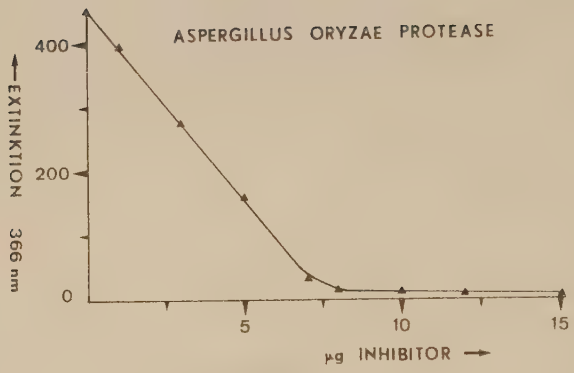

Abb.10 Hemmkurve der Aspergillus Oryzae Protease

Zu gleichbleibenden Mengen der Protease (25 µg) wurden ansteigende Mengen Inhibitor (Fraktion A_2, vgl.Abb.5) hinzugefügt. Verwendetes Substrat: Azo-Casein. Die Versuchsbedingungen sind im Einzelnen im Abschnitt Methoden wiedergegeben.

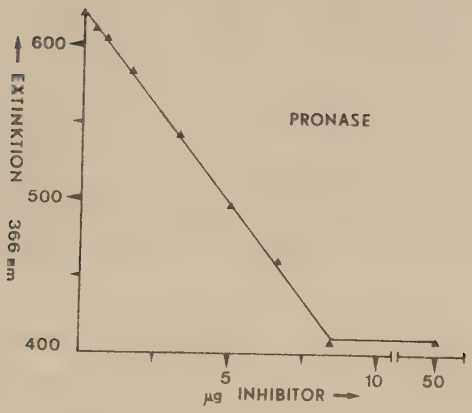

Abb.11 Hemmkurve der Pronase

(Zu beachten ist, daß nur ein Teil der proteolytischen Aktivität der Pronase durch HSMI gehemmt wird)

Zu gleichbleibenden Mengen der Pronase (50 µg) wurden ansteigende Mengen HSMI hinzugefügt. Verwendetes Substrat: Azo-Casein. Die Versuchsbedingungen sind im Einzelnen im Abschnitt Methoden wiedergegeben.

4.5 Reaktive Zentren

Wesentlich verantwortlich für die Hemmwirkung der Trypsininhibitoren sind deren reaktive Zentren. Diese Hemmzentren werden von Lysyl- oder Arginylresten gebildet, bzw. von Peptidsequenzen, die einen dieser Reste enthalten (70 - 76).
Durch Modifizierung der ε-Aminogruppen der Lysylreste mit Maleinsäureanhydrid, bzw. der Arginylreste mit Butandion-(2,3)-Reagens (56) wird die inhibitorische Aktivität der betreffenden Proteinase-Inhibitoren abgeschwächt oder sie verschwindet völlig.
Die Lysin-Inhibitoren verlieren nach der Acylierung der ε-Aminogruppen der Lysinreste ihre Hemmwirkung gegenüber Trypsin, die aber durch Säureeinwirkung wiedergewonnen werden kann. Bei den Arginin-Inhibitoren bleibt nach der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid die Hemmwirkung gegenüber Trypsin vollständig erhalten, die jedoch nach Umsetzung mit Butandion-(2,3)-Reagens relativ rasch und irreversibel verloren geht.
Bei HSMI wurde nach der Maleoylierung keinerlei Abnahme der Hemmaktivität gegenüber Trypsin und Chymotrypsin beobachtet. Anschließend wurde das maleoylierte HSMI-Molekül mit Butandion-(2,3)-Reagens umgesetzt; die Hemmwirkung gegenüber Trypsin ging dabei verloren, während die gegenüber Chymotrypsin erhalten blieb. Daraus kann man schließen, daß ein Argininrest im reaktiven Zentrum für die Trypsinhemmung verantwortlich ist(57). Des weiteren

ist daraus zu schließen, daß das HSMI-Molekül zwei verschiedene reaktive Zentren für die Hemmung von Trypsin und Chymotrypsin besitzt.

An Hand der Hemmkurven von Abb.5 und 7 und an Hand der Ergebnisse der Gelfiltrationsversuche bei der MG-Bestimmung (s.Tab. 4) ist unzweifelhaft zu ersehen, daß das HSMI-Molekül ternäre Komplexe bilden kann. Durch die Bindung an das Trypsin wird das Hemmzentrum für Chymotrypsin oder Subtilisin nicht blokkiert. Man kann aus diesen Angaben schließen, daß das HSMI-Molekül "double-headed" gebaut ist (vgl.Abb.12) und zwei reaktive Zentren besitzt, die sich nicht überschneiden (58).

Ziemlich ähnliche Eigenschaften weisen auch der Ovoinhibitor aus Eiklar (38,59), der Inhibitor AA aus Sojabohnen (61) und der Proteinase-Inhibitor LBI aus Limabohnen (40) auf.

Der HSMI-Subtilisin-Komplex hemmt nur Trypsin, kein Chymotrypsin Aus dieser Tatsache und von den Spezifitätserfordernissen der Proteinasen her (62) kann man annehmen, daß das reaktive Zentrum für Chymotrypsin mit dem für Subtilisin identisch ist. Dasselbe reaktive Zentrum ist auch verantwortlich für die Hemmung der Elastase und wahrscheinlich auch der Aspergillus Oryzae Protease. Leider kann das HSMI-Molekül in schwach sauren Lösungen nicht so leicht modifiziert werden wie z.B. der Kunitz-Inhibitor (60), der Inhibitor AA aus Sojabohnen (61) und der Inhibitor aus Limabohnen (40); Untersuchungen auf diesem Gebiet sind in Vorbereitung.

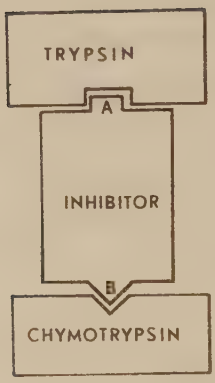

Abb.12 Schematische Darstellung eines Inhibitormoleküls (HSMI) mit zwei reaktiven Zentren A und B

A) Reaktives Zentrum für Trypsin (evt.auch Plasmin)
B) Reaktives Zentrum für Chymotrypsin, Subtilisin, Elastase und Aspergillus Oryzae Protease. Für Pronase konnte der Nachweis noch nicht geführt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Hemmung von Chymotrypsin durch TKIR einen Einzelfall darstellt (63,64). Das umfassende Hemmspektrum von HSMI, ebenso wie das ähnlich weite Hemmspektrum der Ovoinhibitoren, dürfte hauptsächlich zurückzuführen sein auf das für Chymotrypsin zuständige reaktive Zentrum dieser Inhibitormoleküle (s.Abb.12).

4.6 Physiologische Funktion

Unsere Ergebnisse bestärken uns in der Annahme, daß HSMI die Schleimhaut im oberen Teil des Verdauungstraktens von Aasfressern gegen schädliche Wirkungen von Bakterienproteinasen schützt, die mit der Nahrung eingebracht werden (7,26,27,36). Neben der Hemmung von Elastase und Subtilisin vermag HSMI auch einige Proteinasen von Schimmelpilzen zu hemmen. Möglicherweise hat HSMI auch eine besondere Funktion im Zusammenhang mit den Proteinasen, die in der Glandula submandibularis einiger Tiere gefunden wurden (65). Von Wichtigkeit für eine klinische Anwendung könnte sein, daß HSMI die Elastase hemmt. Gegen Trypsininhibitoren ist die Elastase des Pankreas (= Pankreatopeptidase E) relativ unempfindlich; eine Ausnahme stellt HSMI dar. Seine Verwendung in der Therapie einer akuten Pankreatitis (66,67) könnte deshalb angezeigt sein, um Zerstörungen von Zellverbänden durch die Elastase zu verhindern.

Der Hauptinhibitor der Elastase im Serum ist das α_1-Antitrypsin, das neben Trypsin auch einige Leukoproteasen hemmen kann. Bei einem Mangel an α_1-Antitrypsin kommt es häufig zur Ausbildung von Lungenemphysemen (68), da das Lungengewebe durch ungehinderte Aktivität der Enzyme zerstört wird. Als mögliche therapeutische Konsequenz bietet sich auch in diesem Falle HSMI an.

5 Zusammenfassung

5.1 Im Gewebe der Glandula submandibularis des Hundes wurde die bisher höchste Konzentration eines Proteinase-Inhibitors tierischer Herkunft angetroffen. Er wurde im Jahre 1963 von Trautschold, Werle, Haendle und Sebening (25) gefunden.

5.2 Zur Isolierung und Auftrennung der Inhibitorfraktionen wurden folgende Methoden angewandt:

5.2.1 Isolierung aus mit Perchlorsäure behandelten Extrakten und anschließende Auftrennung mittels Gradientenchromatographie

5.2.2 Isolierung aus wäßrigen Extrakten und Auftrennung mittels Gradientenchromatographie. Auftrennungen mittels Gleichgewichtschromatographie ergaben exaktere Auftrennungen und höhere Rein-

heitsgrade.

5.3 Die Auftrennung mittels Gleichgewichtschromatographie ergab vier Inhibitorfraktionen, die sich nur geringfügig in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterschieden (Tab.2 und 3). Bei der Gradientenchromatographie wurde eine Auftrennung in nur zwei Fraktionen erzielt.

5.4 Bei den untersuchten Fraktionen hatte sich als einzige aminoendständige Aminosäure Glycin ergeben.

5.5 Das MG für die verschiedenen Fraktionen liegt zwischen 12 750 und 12 878 (bestimmt aus der Aminosäurezusammensetzung, durch Gelfiltration, auf der Ultrazentrifuge und aus Berechnungen, denen eine spezifische Aktivität von 2,5 IU/mg zu Grunde lag).

5.6 Eine starke Hemmung durch den Inhibitor aus Hundesubmandibularis zeigte sich bei folgenden Enzymen:
Trypsin (aus Rinderpankreas)
α-Chymotrypsin (aus Rinderpankreas)
Elastase (aus Schweinepankreas)
Subtilisin NOVO
Aspergillus Oryzae Protease
Plasmin (von Schweinen gewonnen)
Pronase

5.7 Gegen Kollagenase (Fa. Worthington) und Kallikrein (aus Schweinepankreas) zeigte der Inhibitor aus Hundesubmandibularis keine Hemmwirkung.

5.8 Hinsichtlich der reaktiven Zentren ergab sich, daß ein Argininrest im reaktiven Zentrum für die Trypsinhemmung verantwortlich ist. Für die Hemmung von Chymotrypsin ist ein zweites reaktives Zentrum zuständig. Der Inhibitor aus Hundesubmandibularis ist also "double-headed"; die beiden reaktiven Zentren überschneiden sich nicht. Der HSMI-Chymotrypsin-Komplex und der HSMI-Subtilisin-Komplex - beide Komplexe enthalten äquimolare Mengen an Enzym und Inhibitor - können zusätzlich noch ein Trypsinmolekül binden, so daß ein ternärer Komplex entsteht.

5.8 Die physiologische Bedeutung des Inhibitors sowie eine mögliche klinisch-therapeutische Anwendung werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

1 Kunitz, M.: Science 101, 668 (1945)

2 Kunitz, M.: J. Gen. Physiol. 29, 149 (1946)

3 derselbe, ebenda 30, 291 (1947)

4 Ham, W. E., R. M. Sandstedt: J. Biol. Chem. 154, 505 (1944)

5 Kraut, H., E. K. Frey, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 192, 1 (1930)

6 Kunitz, M., J. H. Northrop: J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936)

7 Vogel, R., I. Trautschold, E. Werle: "Natürliche Proteinasen-Inhibitoren", Stuttgart, 1966

8 Laskowski, M., Jr., R. W. Sealock: "The Enzymes" 3. Auflage, im Druck

9 Luthy, J. A., M. Praissman, M. Laskowski, Jr.: Abstracts, 158th National Meeting of the American Chemical Society, New York, N. Y., September 1969, Biol. No 321

10 Hixson, H. F., Jr., M. Laskowski, Jr.: J. Biol. Chem. 245, im Druck (1970)

11 Laskowski, M., Sr., F. C. Wu: J. Biol. Chem. 204, 797 (1953)

12 Tschesche, H., H. Klein, G. Reidel in H. Fritz und H. Tschesche: Proceedings on the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, Walter de Gruyter u. Co., Berlin 1971, s. 299 - 304.

13 Burck, P. J., R. L. Hamill, E. W Cerwinsky, E. L. Grinnan: Biochemistry 6, 3180 (1967)

14 Fritz, H., I. Hüller, M. Wiedemann, e. Werle: Z. Physiol. Chem. 348, 405 (1967)

15 Fritz, H., K. Hochstraßer, W. Schramm, E. Werle: in Vorbereitung

16 Tschesche, H., H. Klein: Z. Physiol. Chem. 349, 1645 (1968)

17 Greene, L. J., M. Rigbi, D. S. Fackre: J. Biol. Chem. 241, 5610 (1966)

18 Erlanger, B. F., N. Kokowsky: Arch. Biochem. Biophys. 95, 271 (1961)

19 Kassell, B., M. Radicevic, S. Berlow, R. J. Peanasky, M. Laskowski, Sr.: J. Biol. Chem. 238, 3274 (1963)

20 Kassell, B., M. Radicevic, M. Laskowski, Sr.: Fed. Proc. 22, 529 (1963)

21 Fritz, H. M. Gebhardt, E. Fink, W. Schramm, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 129 (1969)

22 Fritz, H. H. Schult, M. Hutzel, M. Wiedemann, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 348, 308 (1967)

23 Fritz, H., I. Trautschold, H. Haendle, E. Werle: Ann. N. Y. Acad. Sci. 146, 400 (1968)

24 Fritz, H., H. Schult, R. Meister, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 1531 (1969)

25 Trautschold, I., E. Werle, H. Haendle, E. Sebening: Z. Physiol. Chem. 332, 328 (1963)

26 Trautschold, I., Habilitationsschrift, I. Medizinische Fakultät der Universität München (1965)

27 Haendle, H., Dissertation, I. Medizinische Fakultät der Universität München (1969)

28 Hochstraßer, K. und Mitarb.: Unveröffentliche Ergebnisse

29 Fritz, H., G. Hartwich, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 345, 150 (1966)

30 Fritz, H., I. Trautschold, E. Werle in : Bergmeyer, H. U., "Methoden der enzymatischen Analyse", Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., S. 1021 (1970)

31 Fritz, H., R. Meister, M. Gebhardt: Unveröffentlichte Ergebnisse

32 Fritz, H., M. Gebhardt, R. Meister, E. Fink.in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 271 - 280.

33 Wünsch, E., H.-G. Heidrich: Z. Physiol. Chem. 333, 149 (1963)

34 Chase, Jr., E. Shaw: Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 508 (1967)

35 Sachar, L. A., K. K. Winter, M. Sicher, S. Frankel: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90, 323 (1955)

36 Trautschold, I., H. Fritz, E. Werle in: Erdös, E. G., N. Back, F. Sicuteri, "Hypotensive Peptides", Springer Verlag, New York (1966)

37 Hochstraßer, K. und Mitarb., in Vorbereitung

38 Feeney, R. in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 189 - 195.

39 Peanasky, R. J., M. Abu-Erreish in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 281 - 293.

40 Stevens, F. C. in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 149 - 155.

41 Fink, E., G. Klein, F. Hammer, G. Müller-Bardorff, H. Fritz in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 225 - 235.

42 Fritz, H., F. Woitinas, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 345, 168 (1966)

43 Cechova, D., V. Jonakova-Svestkova, F. Sorm: Coll. Czechoslov. Commun. 35, 3085 (1970)

44 Laskowski, M., Sr., et al. in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 66 - 73.

45 Beier, G., Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

46 Fritz, H., I. Trautschold, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 342, 253 (1965)

47 Geokas, M. C., P. Silverman, H. Rinderknecht: Gastroenterology 58, 949 (1970)

48 Bailey, L., Techniqes in Protein Chemistry, Elsevier Publishing Company, Amsterdam - London - New York, S. 342f (1967)

49 Porath, J., P. Flodin: Nature (London) 183, 1657 (1959)

50 Granath, K. A., P. Flodin: Makromolekulare Chem. 48, 160 (1961)

51 Walsh, K. A., P. E. Wilcox: Methods in Enzymology 19, 31 (1970)

52 Ryan, C. A., L. K. Shumway in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 175 - 188.

53 Ryan, C. A.: Biochemistry 5, 1592 (1966)

54 Die Werte sind entnommen aus: Methods in Enzymology, 19, (1970): Proteolytic Enzymes

55 Wählby, S., Biochem. Biophys. Acta 151, 394 (1968)

56 Grossberg, A. L., D. Pressman: Biochemistry 7, 272 (1968)

57 Fritz, H., E. Fink, M. Gebhardt, K. Hochstrasser, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 933 (1969)

58 Feeney, R. E., R. G. Allison: Evolutionary Biochemistry of Proteins, Wiley Interscience, New York, S. 199f (1969)

59 Davis, J. G., J. C. Zahnley, J. W. Donovan: Biochemistry 8, 2044 (1969)

60 Laskowski, M., Jr., R. Duran, W. R. Finkenstadt, S. Herbert, H. F. Hixson, Jr., D. Kowalski, J. A. Luthy, J. A. Mattis, R. E. McKee, C. W. Niekamp in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 117 - 134.

61 Birk, J., A. Gertler in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 142 - 148.

62 Shotton, D. in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 47 - 55.

63 Rigbi, M. in Proc. Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors (12), S. 74 - 87.

64 Fritz, H., H. Schult, R. Meister, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 1531 (1969)

65 Levy, M., L. Fishman, I. Schenkein: Methods in Enzymology 19, 672 (1970)

66 Nagel, W., F. Willig: Klin. Wschr. 42, 400 (1964)

67 Mandl, I.: Collagenases and Elastases, Adv. Enzymology 23, 163 (1961)

68 Lectures presented at the International Symposion on Proteolysis and Pulmonary Emphysema under the auspices of the City of Hope Medical Center on January 4-6, 1971 in Pasadena, USA. Lieberman, J., Digestion of antitrypsin deficient lung by leukoproteases; Janoff, A., Elastase-like proteases of human granulocytes and alveolar macrophages; Keller, S. and I. Mandl, Qalitative differences between normal and emphysematous human lung elastin; Adamson, J., R. Bruce and J. Pierce, Collagen and elastin in antitrypsin emphysema; Senior, R., Paul Huebner and J. Pierce, Elastase inhibitory capacity and elastin agar gel; Turino, G. and R. Lourenco, Role of connective tissue in lung mechanics; Kimbel, P., V. Marco, B. Mass, D. Meranze and G. Weinbaum, Emphysema in dogs induced by leucocyte contents; Mandl, I., S. Keller, Y. Hosannah and C. Blackwood, Induction and prevention of experimental emphysema.

69 Spackman, D. H., W. H. Stein, S. Moore: Anal. Chem. 30, 1190 (1958)

70 Feeney, R. E.: Biochemistry (Washington) 7, 2886 (1968)

71 Finkenstadt, W. R., M. Laskowski, Jr.: J. Biol. Chem. 240, PC 962 (1965)

72 dieselben, ebenda 242, 771 (1967)

73 Haynes, R., R. E. Feeney: J. Biol. Chem. 242, 5378 (1967)

74 Haynes, R., R. E. Feeney: Biochemistry 7, 2879 (1968)

75 Haynes, R., D. T. Osuga, R. E. Feeney: Biochemistry 6, 541 (1967)

76 Ozawa, K., M.Laskowski, Jr.: J. Biol. Chem. 241, 3955 (1966)

LEBENSLAUF

Geboren:	25.3.1942 in Ingolstadt
Vater:	Eugen Jaumann, Oberlokführer i. R.
Mutter:	Amalie, geb. Mederer
1949 - 1953:	Volksschule St. Moritz, Ingolstadt
1953 - 1962:	Humanistisches Gymnasium, Ingolstadt Reifeprüfung: Juli 1962
1962 - 1964:	Ableistung der Wehrpflicht
seit Mai 1964:	Studium der Humanmedizin an der Universität München
WS 1964/65:	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
SS 1966:	Ärztliche Vorprüfung
17.12.1969:	Abschluß der ärztlichen Prüfung
1.2.1970 - 31.9.1970 :	Medizinalassistent am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie an der Chirurgischen Klinik der Universität München, Arbeiten an vorliegender Dissertation
15.10.1970 - 15.2.1971:	Chirurgische Ausbildung als Medizinalassistent am Ambulatorium der Chirurgischen Klinik der Universität München
ab März 1971:	Wissenschaftlicher Angestellter beim Sonderforschungsbereich 51, München